Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 15, No. 2, Summer 2023, p. 211-223

The Effect of Oxidative Stress and Dietary Vitamin E Supplementation on Fresh Sperm Quality of Ross 308 Broiler Breeder Roosters

Zabihollah Nemati[1*], Namdar Kamrani[2], Mohammad Sattari[2], Amir Karimi[3], Magsoud Besharati[1]

Received: 24-05-2022
Revised: 26-09-2022
Accepted: 18-01-2023
Available Online: 18-01-2023

How to cite this article:
Nemati, Z., Kamrani, N., sattari, M., Karimi, A., & Besharati, M. (2023). The effect of oxidative stress and dietary vitamin E supplementation on fresh sperm quality of Ross 308 broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(2), 211-223.
DOI: 10.22067/ijasr.2023.75961.1070

Introduction: Oxidative stress is an imbalance between oxidants and antioxidants at the cellular level which leads to the condition of infertility in male. Oxidation of cell macromolecules, cell death by necrosis, apoptosis and damage of tissue structure are the results of another oxidative stress damage. This process eventually leads to a variety of diseases, reduced growth performance and even death (Min et al. 2018). Poultry face a variety of environmental, technological, nutritional, and biological stresses that reduce their productivity and reproductive performance. Most of these stresses at the molecular level are associated with oxidative stress and damage to biologically important molecules (Surai et al. 2019). Qualitative characteristics of sperm, blood testosterone level, and plasma lipid peroxidation are affected by severe oxidative stress (Khan, 2011). Vitamin E is an important known antioxidant and protect cell membrane of sperm cell from damage of reactive oxygen species in male reproductive system of animal. Feeding of this vitamin has beneficial effect on testes weight, semen quality indexes, testosterone and antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and superoxide dismutase in birds and mammals. The objective of this experiment was to investigate the effect of diet vitamin E supplementation on fresh sperm quality in broiler breeder roosters challenged with oxidative-stress.

Materials and Methods: Eighteen Ross 308 male broiler breeder at 28 weeks of age were randomly assigned into 3 experimental groups including control group, dexamethasone group (subcutaneous injection of 4 mg dexamethasone per kg body weight) and dexamethasone group receiving supplemented diet with of vitamin E (200 mg per kg of feed). Each experimental group consisted of 6 birds. Sperm samples were taken from roosters using abdominal massage method and analyzed for quality characteristics and antioxidant status. Sperm concentration was determined by counting spermatpzoa using hemocytometer. The pooled sperm sample was diluted by using poultry semen extender and then 10 µl of diluted sperm mixed with 10 ml of 3% NaCl. The chambers of hemacytometer filled with 10 µl sperm suspension and allowed to settle for 3 mines. Numbers of sperm cell in 5 of the large squares of chamber were assessed. Computer assisted semen analyses (CASA) were performed to determine sperm motility, with settings adjusted to detecting domestic fowl according to a previously described method (Froman and Feltmann, 2000). Total, progressive and non-progressive motility (%), as well as immotile sperms were measured. Also, sperm kinematic values including straight line velocity (VSL (µm/s)), curvilinear velocity (VCL (µm/s), average path velocity (VAP (µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH (µm), and beat-cross frequency (BCF (Hz) were measured. Progression ratios were also calculated using the mentioned velocity measurements: straightness (STR = VSL/VAP) and linearity (LIN = VSL/VCL).

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- M.Sc. Graduate Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding Author's Email: znnemati@yahoo.com, znemati@tabrizu.ac.ir

Results and discussions: The results indicate that dexamethasone-induced oxidant stress caused an increase in MDA levels (5.4) and a decrease in the activity of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (52.51) and superoxide dismutase (108.62), as well as sperm motility parameters and sperm cell membrane integrity in comparison to the control group. However, when vitamin E was added to the roosters' diet, it improved the negative effects of oxidative stress on sperm motility parameters, antioxidant status (Total antioxidant capacity (1.65), superoxide dismutase (155.10) and glutathione peroxidase (87.77) enzymes), sperm viability (88.05), and sperm cell membrane integrity (89.72) ($P<0.05$). These findings suggest that dexamethasone injection caused a sharp decline in sperm quality by reducing sperm motility, antioxidant enzyme activity, and plasma membrane integrity, while vitamin E supplementation improved sperm quality by enhancing the antioxidant status and protecting the sperm cell membrane from the damage caused by reactive oxygen species in broiler breeders.

Avian sperm are highly susceptible to lipid peroxidation due to their high content of long-chain polyunsaturated fatty acids. Lipid peroxidation produces reactive species that damage sperm membrane function and motility, ultimately reducing the fertility potential of aged roosters. Therefore, the antioxidant defense plays a critical role in maintaining semen quality (Surai et al., 2006).

Conclusion: It can be concluded that the inclusion of vitamin E in diet remarkably improved the sperm motility characteristics and antioxidant status of sperm in broiler breeder roosters challenged with oxidative stress. On bases of this finding it’s recommended to use of vitamin E in the rooster diet to elucidate negative effect of oxidative stress.

Keywords: Broiler breeder rooster, Oxidative stress, Sperm quality, Vitamin E

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، ص. ۲۲۳-۲۱۱

تأثیر مکمل ویتامین E جیره غذایی بر کیفیت اسپرم تازه خروس‌های مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ چالش یافته با تنش اکسیداتیو

ذبیح‌اله نعمتی[۱*]، نامدار کامرانی[۲]، محمد ستاری[۲]، امیر کریمی[۳]، مقصود بشارتی[۱]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

چکیده

هدف از انجام این آزمایش، بررسی اثر افزودن ویتامین E به جیره غذایی بر کیفیت اسپرم در خروس‌های تحت تنش اکسیداتیو بود. تعداد ۱۸ قطعه از خروس گله مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۲۸ هفتگی به‌صورت تصادفی در سه گروه آزمایشی شامل گروه شاهد، گروه دگزامتازون (تزریق زیر پوستی چهار میلی‌گرم دگزامتازون به‌ازای کیلوگرم وزن بدن) و گروه دگزامتازون دریافت‌کننده جیره مکمل شده با ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین E درکیلوگرم خوراک، اختصاص داده شد. هر گروه آزمایشی شامل شش پرنده بود. اسپرم‌گیری از خروس‌ها با استفاده از روش ماساژ شکمی انجام و خصوصیات کیفی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های اسپرم به‌روش استاندارد ارزیابی شد. نتایج نشان‌داد، القای تنش اکسیداتیو با تزریق دگزامتازون سبب افزایش مالون دی‌آلدهید و کاهش یکپارچگی غشای پلاسمای، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و شاخص‌های حرکتی اسپرم، در مقایسه با گروه شاهد شد. افزودن ویتامین E به جیره‌غذایی خروس‌ها سبب بهبود اثرات منفی تنش اکسیداتیو بر شاخص‌های حرکتی اسپرم، وضعیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های سوپراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز)، قابلیت زنده‌مانی و یکپارچکی غشای اسپرم شد. می‌توان نتیجه گرفت، گنجاندن ویتامین E در جیره غذایی می‌تواند سبب بهبود خصوصیات حرکتی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم در خروس‌های تحت تنش شود.

واژه‌های کلیدی: خروس مادر گوشتی، تنش اکسیداتیو، کیفیت اسپرم، ویتامین E

مقدمه

یکی از مسائل اساسی در صنعت طیور مدرن که تولیدکنندگان با آن مواجه هستند، تنش است. پرندگان اغلب در معرض عوامل تنش‌زا محیطی، تغذیه‌ای و عوامل بیماریزا مانند سموم، محدودیت، حمل و نقل و تنش گرمایی قرار دارند (Mishra and Jha, 2019; Nemati *et al.*, 2014a; Nemati *et al.*, 2014b; Nemati *et al.*, 2015). در شرایط استرس، علاوه‌بر اینکه سیستم غدد درون‌ریز و محور آدرنال - هیپوتالاموس - هیپوفیز و غدد تیروئید پرنده به‌میزان قابل توجهی تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد (Siegel, 1980)، بلکه میزان مصرف خوراک، سرعت رشد، و باروری هم کاهش می‌یابد (El-Lethey *et al.*, 2000; Gross, 1993). اثرات کاتابولیکی بیش از حد هورمون‌های گلوکوکورتیکوئید از منابع درون‌زا یا برون‌زا قبلاً به‌خوبی اثبات شده است (Akiba *et al.*, 1992; Ohtsuka *et al.*, 1992) به‌طوری‌که با استفاده از گلوکوکورتیکوئیدها و ضعیت تنش اکسیداتیو در مرغ ایجاد می شود (Eid *et al.*, 2003). به‌طور مشابه در آزمایش تجربی نشان داده شده است که استفاده از گلوکوکورتیکوئید مصنوعی دگزامتازون (DEX)، اثرات منفی افزایش کورتیکواسترون را در بدن پرنده القاء می‌کند (Eid *et al.*, 2006). مطالعات قبلی نشان

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: znnemati@yahoo.com, znemati@tabrizu.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2023.75961.1070

می‌دهد، تزریق دگزامتازون به‌میزان ۰/۲ تا ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌عنوان یک عامل سرکوب‌کننده سامانه ایمنی (Fowles *et al.*, 1993)، و واسطه‌گر تنش قبل از تولد عمل می‌کند (Maccari *et al.*, 2003; Welberg and Seckl, 2001) و در سطح چهار میلی‌گرم در روز سبب القاء تنش اکسیداتیو در مرغ‌های تخم‌گذار (El-Habbak *et al.*, 2005) و خروس‌های مادر (Min *et al.*, 2018) می‌شود. در شرایط تنش اکسیداتیو گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن شکل می‌گیرد که آن‌ها می‌توانند با اکسیداسیون ماکرومولکول‌ها، اسکلت سلولی و آکسونمی اسپرم سازنده را تغییر می‌دهد و منجر به کاهش تحرک اسپرم (De Lamirande and Ggnon, 1992)، مهار لقاح اسپرم و تخمک‌ها (John Aitken *et al.*, 1989) و کاهش باروری می شود (Wishart, 1984). یکی از راهکارهای مقابله با شرایط تنش اکسیداتیو در پرنده استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است چرا که مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی پاسخ فیزیولوژیکی به تنش در حیوان را افزایش می‌دهند (Eid *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 1999). بنابراین، در حال حاضر به منظور جلوگیری از ایجاد شرایط تنش اکسیداتیو، از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف از قبیل مکمل ویتامینی، آنتی‌اکسیدان‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌صورت انفرادی و یا توأم در جیره غذایی در طیور استفاده می‌شود (Mishra and Jha, 2019; Nemati *et al.*, 2022). ویتامین E جزء اصلی سیستم آنتی‌اکسیدانی اسپرم محسوب می‌شود (Lenzi *et al.*, 1996) که کارآمدترین روبش محافظ رادیکال‌های پراکسید در لایه‌های فسفولیپید غشای سلول است. اثرات سودمند ویتامین E جیره غذایی بر بهبود رشد و پروکسیداسیون بافت، پایداری گوشت (Guo *et al.*, 2013; Nemati *et al.*, 2020b) و عملکرد تولید مثلی خروس (Danikowski *et al.*, 2002) و وضعیت آنتی‌اکسیدانی خون بلدرچین (Nemati *et al.*, 2020a) گزارش شده است. همچنین ویتامین E می‌توانند کیفیت اسپرم منجمد را در گاوها (Towhidi and Parks, 2012)، قوچ‌ها (Silva *et al.*, 2013) و خروس‌ها بهبود بخشد (Amini *et al.*, 2015a; Moghbeli *et al.*, 2016). افزودن مکمل ویتامین E به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در جیره غذایی سبب افزایش غلظت آن را در خون و مایع منی خروس می‌شود و علاوه‌براین باعث ایجاد تغییرات مفیدی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مشخصات لیپید مایع منی خروس در شرایط عادی (Surai *et al.*, 1997b) و بهبود عملکرد ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در خروس‌های مادر تحت تنش اکسیداتیو با دگزامتازون می شود (Min *et al.*, 2018). بنابراین، با توجه با اهمیت موضوع و ضرورت ارزیابی کیفیت اسپرم در خروس‌های مرغ مادر، این آزمایش با هدف بررسی تأثیرگذاری ویتامین E بر ویژگی‌های حرکتی و قدرت زنده‌مانی اسپرم و سیستم آنتی‌اکسیدانی خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو از طریق تزریق دگزامتازون بود.

مواد و روش‌ها

حیوان و گروه‌های آزمایشی

این تحقیق در سالن مرغداری دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی با ۱۸ قطعه خروس سویه راس ۳۰۸ با میانگین وزنی ۸۰±۳۸۰۰ گرم در سن ۲۸ هفتگی در سه گروه و شش پرنده در هر گروه به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. سالن مجهز به سیستم پرورش در قفس انفرادی، آبخوری نیپلی و غذادهی دستی بود و همه گروه‌های آزمایشی با دو نوبت غذادهی (۱۰۰ گرم در روز برای هر خروس) بر اساس جیره غذایی بر پایه کاتالوگ ۲۰۱۸ سویه راس۳۰۸ (جدول ۱) و دسترسی آزاد به آب، با برنامه نوردهی ۱۵ ساعت روشنایی و نه ساعت تاریکی نگهداری شدند. گروه‌های آزمایشی شامل ۱- جیره غذایی پایه (شاهد) ۲- جیره غذایی پایه و تزریق زیر پوستی دگزامتازون به‌مقدار چهار میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن (دگزامتازون) ۳- دگزامتازون + ویتامین E به‌میزان ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک، بودند. مکمل ویتامین E (آلفا توکوفرول استات) با درجه خلوص ۶۰ درصد از شرکت لابراتوار سیانس ایران تهیه شد. به‌منظور عادت‌دهی خروس به‌مدت ۱۴ روز در داخل قفس نگهداری و به‌روش ماساژ شکمی اسپرم‌گیری شدند، سپس در هفت روز بعد خروس‌های آزمایشی به غیر از گروه شاهد تزریق دگزامتازون را به‌صورت یک روز در میان دریافت کردند.

اسپرم‌گیری و تزریق دگزامتازون

دگزامتازون مورد نیاز از شرکت دارویی ابوریحان تهیه شد و به صورت زیرجلدی و از ناحیه شکمی در سه نوبت یک روز در میان به مدت یک هفته انجام گرفت (Min *et al.*, 2018) به‌صورت مشابه نیز در گروه شاهد تزریق محلول سرم فیزیولوژیکی، انجام گرفت. سه هفته پس از اعمال گروه‌های آزمایشی، اسپرم‌گیری از خروس‌ها با استفاده از روش ماساژ شکمی دو بار در هفته و به‌مدت دو هفته انجام گرفت (Burrows and Quinn, 1937). نمونه‌های منی هر خروس داخل میکروتیوب جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شدند تا ارزیابی اولیه از نظر تحرک، غلظت و رنگ اسپرم انجام شود. اسپرم‌های با تحرک ۷۵ درصد و غلظت مناسب به‌عنوان اسپرم‌های طبیعی در نظر گرفته شده و در مرحله بعدی آزمایش، جهت از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌ها با هم مخلوط شدند. رقیق‌کننده بلتسویل بهبودیافته برای رقیق کردن اسپرم و اندازه گیری خصوصیان کیفی آن استفاده شد. مواد تشکیل‌دهنده محیط رقیق‌کننده از شرکت مرک آلمان تهیه گردید که شامل پتاسیم دی فسفات (۱۲/۷ گرم در لیتر)، سدیم گلوتامات (۸/۶۱ گرم در لیتر)، فروکتوز (۵ گرم در لیتر)، سدیم استات (۴/۳ گرم در لیتر)، تریس (۱/۹ گرم در لیتر)، پتاسیم سیترات (۰/۶۴ گرم در لیتر)، پتاسیم مونو فسفات (۰/۶۵ گرم در لیتر)، کلراید

منیزیم (۰/۳۴ گرم در لیتر) بودند.

جدول ۱- جیره غذایی خروس مادر راس ۳۰۸ در دوره آزمایش

Table 1- Ross 308 male broiler breeder diet in experimental period

مواد خوراکی[1] Ingredient[1]	مقدار (%) Content (%)	ترکیب شیمیایی Chemical composition	مقدار Content
دانه ذرت Corn	57	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم) Metabolism Energy (kcal/kg)	2750
کنجاله سویا (پروتئین خام، ۴۴٪) Soybean meal (Cp, 44%)	10	پروتئین خام (٪) Crude protein (%)	12
دانه جو Barley grain	11	متیونین- سیستئین (٪) Methionine-cysteine (%)	0.45
سبوس گندم Wheat bran	18	لایزین (٪) Lysine (%)	0.5
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.3	ترئونین (٪) Threonine (%)	0.38
پوسته صدف Oyster shell	1.6	کلسیم (٪) Calcium (%)	0.7
مکمل ویتامین معدنی[1] Mineral vitamin supplement	0.5	فسفر (٪) Phosphorus (%)	0.35
نمک طعام Common salt	0.3	سدیم (٪) Sodium	0.18
سدیم بیکربنات Sodium bicarbonate	0.05	کلر (٪) Chlorine (%)	0.16
دی ال- متیونین DL-Methionine	0.11	لینولئیک اسید (٪) Linoleic acid (%)	1
ویتامین ب Vitamin B	0.01		
ویتامین ای Vitamin E	0.01		
کولین کلراید Choline chloride	0.01		

[1] هرکیلوگرم مکمل شامل: ویتامین A ۳۶۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین,D3 ۸۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ، ویتامین E ۷۲۰۰ واحد بین‌المللی ، ویتامین B1 ۷۲۰ میلی‌گرم، ویتامین B2 ۲۶۴۰ میلی‌گرم، اسید پانتوتنیک ۴۰۰۰ میلی‌گرم، اسید نیکوتنیک ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم، ویتامین B6 ۱۲۰۰ میلی‌گرم، اسید فولیک ۴۰۰ میلی‌گرم، ویتامین B12 ۶ میلی‌گرم، ویتامین K3 ۸۰۰ میلی‌گرم، بیوتین ۴۰ میلی‌گرم، کولین کلراید ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم و آنتی‌اکسیدان ۴۰۰۰۰ میلی‌گرم. ۴۰ گرم منگنز به‌شکل سولفات منگنز، ۸۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۵۰ گرم آهن به‌شکل سولفات آهن، ۱۰ گرم مس به‌شکل سولفات مس، ۴۰۰ میلی‌گرم ید.

[1] Vitamin and mineral premix provides per kilogram of diet: vitamin A, 3600,000 IU ; vitamin D3, 800,000 IU; vitamin E, 7200 IU; thiamin HCl, 720 mg; riboflavin, 2640 mg; nicotinic acid, 12000 mg; folic acid, 400 mg; pyridoxine, 1200 mg; biotin, 40 mg; vitamin B12, 6 mg; choline Cl, 100,000 mg; Antioxidant, 40000 mg; Mn (from $MnSO_4 \cdot H_2O$,(40 mg; Se, 80 mg; Fe (from $FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 50 g; Cu (from $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 10 g; Cu [from CuSo4], 10 g; I, 400 mg.

ارزیابی تحرک اسپرم با سیستم کاسا

تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی بودن تحرک، درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها، تحرک عرضی سر، فرکانس حرکات جانبی توسط سیستم آنالیز رایانه‌ای مجهز به میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed LX400) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و نرم‌افزار (Video test-sperm 3.2, USA)، ارزیابی شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی رقیق شده را روی لام ریخته و یک لامل تمیز روی آن قرار داده شد و فرآسنجه‌های جنبایی اسپرم با استفاده از کامپیوتر ارزیابی شد (da Silva Maia *et al.*, 2009).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم

این آزمایش بر اساس تست هایپواسموتیک (HOST) حاوی فروکتوز (نه گرم) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم)، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول در محیط اسپرم طراحی شد. اسپرم‌های با دم گره خورده به‌عنوان اسپرم‌های دارای غشای یکپارچه و اسپرم‌های که دم آن‌ها صاف بود، به‌عنوان اسپرم دارای غشای غیر یکپارچه تلقی شد (Revell and Mrode, 1994). برای این منظور

۱۰ میکرولیتر اسـپرم رقیق‌شـده را با ۲۰ میکرولیتر محلول هاسـت مخلوط کرده و وضـعیت اسـپرم‌های با دم صـاف و دم پیچیده زیر میکروسـکوپ (Olympus, Japan) با عدسـی ×۴۰ مورد بررسـی و ارزیابی قرار گرفت.

وضعیت زنده‌مانی اسپرم

وضعیت زنده‌مانی اسپرم‌ها به‌وسیله رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین بررسـی شـد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر منی رقیق‌شـده را با ۲۰ میکرولیتر رنگ حاوی رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم)، رنگ نیگروزین (۱۰ گرم) و سیترات سدیم (۲/۹ گرم) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده و گستر شی بر روی لام تهیه شد و زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ ا سپرم به‌وسـیله میکروسـکوپ نوری (Olympus, Japan) با بزرگ‌نمایی ×۴۰ مورد بررسـی قرار گرفت. اسـپرم‌هایی که به‌طور کلی یا جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند را مرده و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند، اسپرم‌های زنده در نظر گرفته شد (Evans and Maxwell, 1987).

اندازه‌گیری وضعیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم

برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید به‌عنوان شـاخص پراکسـیداسـیون لیپید، مقدار یک میلی‌لیتر از منی رقیق‌شـده با یک میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد مخلوط شده و سپس نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شده و به تعداد سه بار با بافر سـیترات شـسـتشـو و مجدداً سـانتریفیوژ شـدند. در نهایت، محلول رویی دور ریخته شـده و رسـوب باقی‌مانده اسـپرم‌ها در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شـد. برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه را برداشـته و با یک میلی‌لیتر محلول اسـیدتری کلریدریک ۲۰ درصـد و تیوباربیتوریک اسـید ۰/۵ درصد مخلوط شده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها بعد از سرد شدن، به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان، عدد جذب مالون دی آلدئید محلول بالایی توسـط دسـتگاه اسـپکتروفتومتر (JENWAY-6405، انگلیس) در طول موج ۵۸۶ نانومتر، خوانده شـده و غلظت مالون دی آلدئید ثبت شد (Peris *et al.*, 2007b).

شاخص‌های ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و سوپراکسید دیسموتاز در اسـپرم توسـط کیت‌های تجاری شـرکت طب پژوهان (ایران- تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد؛ ضرایب تغییرات سنجش داخل و بین اندازه‌گیری‌ها به‌ترتیب ۵/۷ و ۳/۷ درصـد برای ظرفیت کـل آنتی‌اکسـیـدانی و ۸/۰ و ۷/۱ درصـد برای سـنجش سوپراکسیددیسموتاز بود. سنجش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز توسط کیت تجاری زل‌بیو (Zellbio GmBH, Germany) انجام شـد و مقادیر ضـرایب تغییرات سـنجش داخل و بین اندازه‌گیری‌ها به‌ترتیب ۳/۵ و ۴/۷ بود. کلیه خوانش‌ها با د ستگاه اتوآنالایزر (آل سیون ۳۰۰) و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به د ست آمده از این آزمایش شامل تحرک کل، تحرک پیش رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشـاء و داده‌های مربوط به‌میزان مالون دی آلدهید سـمینال پلاسـما (MDA)، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدان توسط رویه GLM نرم‌افزار SAS و در قالب طرح کاملاً تصـادفی مورد ارزیابی قرار گرفت (معادله ۱). مقایسات میانگین گروه‌ها با آزمون دانکن انجام شده و نتایج به‌صورت میانگین مربعات خطا در سطح ۵ درصد ($P<0.05$) گزارش گردید.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad \text{(۱) معادله}$$

که در این معادله، Y_{ij}: مقدار عملکرد صـفت وابسـته نمونه jام در تیمار iام، μ: میانگین کل تیمار، T_i: اثر تیمار و e_{ij}: اثرات باقی‌مانده، هستند.

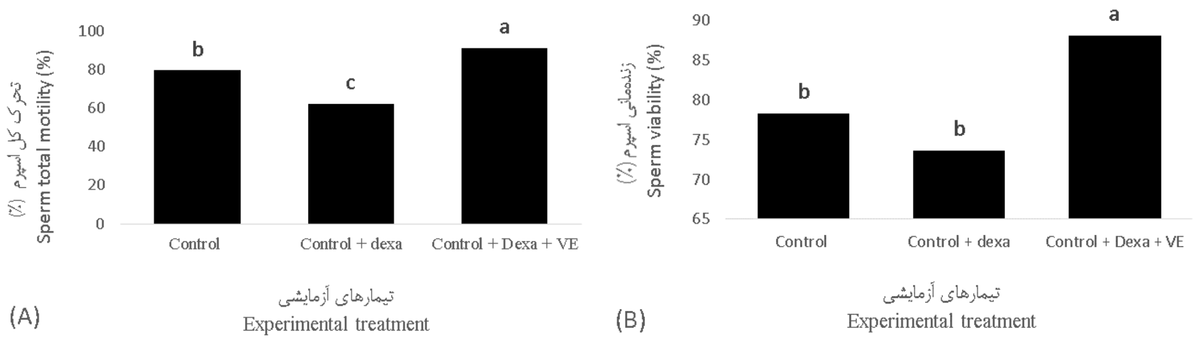
نتایج و بحث

نتیجه آنالیز داده‌های مربوط به تحرک کل و زنده‌مانی ا سپرم تازه در شکل ۱ م شاهده می شود. میزان زنده‌مانی ا سپرم خروس‌ها تحت تأثیر تیمارهای آزمای شی قرار گرفت ($P\leq0.05$). بی شترین و کمترین م قدار ز نده مانی به‌تر تیب مربوط به خروس های در یا فت‌کن نده دگزامتـازون و جیره غـذایی حـاوی مکمـل ویتـامین E و گروه دریافت‌کننده دگزامتازون بود. ایجاد تنش اکسـیداتیو القایی با تزریق دگزامتازون سبب کاهش عددی میزان زنده‌مانی ا سپرم در مقای سه با گروه شاهد شد. افزودن مقادیر بالای مکمل ویتامین E به جیره غذایی خروس های تحت تنش نه تنها سـبب جبران اثرات منفی تنش بر میزان زنده‌مانی اسپرم شد، بلکه میزان آن را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. مشـابه نتایج این آزمایش، افزایش در زنده‌مانی اسـپرم خروس پس از مکمل‌سـازی جیره با ویتامین E به‌مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشـاهده شـده اسـت (Asl *et al.*, 2018). همچنین محققین گزارش کردند، ویتامین E با افزایش زنده‌مانی ا سپرم، کیفیت منی خروس را بهبود می‌بخ شد (Franchini *et al.*, 2001). نتایج نشـان می‌دهد، گروه دریافت‌کننده دگزامتازون، سـبب کاهش معنی‌دار در تحرک کل اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد (شکل ۱). بیش‌ترین مقدار تحرک پیش‌رونده مربوط به گروه شـاهد می‌باشـد که اختلاف معنی‌داری با دو گروه دیگر دارد. گروه دریافت‌کننده دگزامتازون که جیره آن‌ها با ویتامین E مکمل‌سـازی شـده بود، در مقایسـه با گروه

دریافت‌کننده دگزامتازون، دارای تحرک پیش‌رونده بیشتر می‌باشد (جدول ۲). مطابق با آزمایش حاضر، نشان دادند که تزریق دگزامتازون به‌مقدار چهار میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، سبب کاهش تحرک کل در مقایسه با گروه شاهد شد (Eid *et al.*, 2006). افزودن ویتامین E به خوراک خروس‌های تحت تنش (دریافت‌کننده دگزامتازون) سبب بهبود تحرک کل در مقایسه با گروه‌های شاهد و دریافت‌کننده دگزا شد ($P≤۰/۰۵$). استفاده از ویتامین E به‌مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک در جیره خروس‌های محلی مصری که تحت تنش اکسیداتیو با تزریق چهار میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفته بودند، سبب بهبود تحرک اسپرماتوزوآ در مقایسه با گروه شاهد و سایر گروه‌ها شد (Eid *et al.*, 2006) که مشابه نتایج آزمایش حاضر می باشد. همچنین در مطالعه‌ای نشان دادند که افزودن ویتامین E در جیره غذایی خروس، سبب افزایش تحرک اسپرماتوزوئید شد (Asl *et al.*, 2018). همچنین افزودن مقدار دو میلی‌گرم سیکلودکسترین- ویتامین E در رقیق‌کننده اسپرم قوچ، سبب بهبود تحرک اسپرماتوزوآ شد (Benhenia *et al.*, 2018). در مطالعه اخیر در مورد انسان‌ها، محققان دریافتند که مصرف آنتی‌اکسیدان بیشتر با افزایش تعداد اسپرم و تحرک بیشتر آن همراه است (Eskenazi *et al.*, 2005). پیشنهاد شده است که ویتامین E با اتصال به اندو پراکسیدها می‌تواند مورفولوژی و تحرک سلول های اسپرم را حفظ کند (Marin-Guzman *et al.*, 2000).

اثر تنش اکسیداتیو و مکمل ویتامین E بر خصوصیات حرکتی اسپرم تازه خروس‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تزریق دگزامتازون به‌عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو، سایر شاخص های حرکتی را کاهش می دهد ($P≤۰/۰۵$). دگزامتازون احتمالاً سبب افزایش تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن می شود، به‌طوری که نتایج افزایش مالونیل آلدئید و کاهش آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پروکسیداز اسپرم (جدول ۴) به‌واسطه شرایط استرسی مؤید این موضوع است و این امر می تواند دلیل تأثیر منفی آن بر اکثر شاخص‌های حرکتی باشد که نتایج ما هم سو با نتایج سایر محققان است، مبنی بر افزایش مالونیل آلدئید و کاهش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز در بدن است. محققین نشان دادند، تولید بالاتر گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) ممکن است تعداد سلول‌های آسیب دیده را افزایش داده باشد و اثرات منفی بر روی شاخص‌های حرکتی اسپرم داشته باشد (Rover Júnior *et al.*, 2001).

نتایج داده‌های مربوط به یکپارچگی غشای پلاسمایی در جدول ۳ نشان داده شده است. تزریق دگزامتازون سبب کاهش یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در مقایسه با دو گروه دیگر شده است. استفاده از ویتامین E در جیره خروس‌های تحت تنش با دگزامتازون سبب حفظ مناسب یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم شد که نشان‌دهنده نقش محافظتی ویتامین E می‌باشد که موافق با نظر سایر پژوهشگران می‌باشد که بیان کرده‌اند، ویتامین E به‌واسطه محافظت از غشای سلولی (Peris *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2001) از طریق قطع واکنش زنجیره پراکسیداسیون لیپیدی و به دام انداختن گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است (Niki, 2014).



شکل ۱– اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر تحرک کل (A) و زنده‌مانی اسپرم تازه (B) خروس‌های مادر گوشتی تحت استرس اکسیداتیو با دگزامتازون

Figure 1- Effects of vitamin E supplementation on the total motility (A) and viability (B) of fresh sperm in broiler breeder roosters under oxidative stress with dexamethasone

جدول ۲- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر تحرک و شاخص‌های حرکتی اسپرم خروس‌های مادر گوشتی تحت استرس اکسیداتیو با دگزامتازون

Table 2- Effects of vitamin E supplementation on the motility parameters of broiler breeder rooster sperm under oxidative stress with dexamethasone

فراسنجه ها[1] Parameters[1]	تیمارها[2] [2]Treatment			انحراف استاندارد میانگین	احتمال معنی داری
	شاهد Control	شاهد با دگزامتازون Control with dexamethasone	ویتامین E با دگزامتازون Vitamin E with dexamethasone	SEM	P value
تحرک پیش‌رونده (٪) PM (%)	42.53[a]	27.03[c]	35.83[b]	1.61	<0.0001
میانگین سرعت در مسیر (میکرومتر در ثانیه) VAP (µm.s)	40.04[a]	17.96[b]	27.02[b]	2.88	0.0014
سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر در ثانیه) VSL (µm.s)	34.8[a]	15.24[b]	20.69[b]	2.92	0.0029
سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر در ثانیه) VCL (µm.s)	74.09[b]	40.49[b]	70.09[a]	3.85	0.0003
خطی بودن تحرک (٪) LIN (%)	38.69	30.81	29.87	2.68	0.0863
درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها (٪) STR (%)	77.14	65.91	73.29	3.21	0.0916
جنبایی عرضی سر (میکرومتر) ALH (µm)	2.01[a]	1.03[b]	1.97[a]	0.105	0.0002
فرکانس حرکات جانبی (هرتز) BCF (Hz)	13.89[b]	15.13[a]	14.73[ab]	0.27	0.0275

[1] تیمارها با حروف متفاوت در هر سطر از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

[1] Different letters in the same row show statistically differences ($P < 0.05$).

[2] حرکت پیش‌رونده، میانگین سرعت در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم، سرعت در مسیر منحنی، خطی بودن تحرک، درصد مستقیم‌الخط بودن حرکت اسپرم‌ها، جنبایی عرضی سر و فرکانس حرکات جانبی.

[2] Pm (Progressive Motility), VAP (Average Path Velocity), VSL (Straight Line Velocity), VCL (Curvi Linear Velocity), LIN (Linearity), STR (Straightness), ALH (Lateral Head Displacement), BCF (Beat Cross Frequency).

جدول ۳- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر یکپارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم تازه خروس تحت استرس اکسیداتیو با دگزامتازون

Table 3- Effects of vitamin E supplementation on plasma membrane integrity and fresh sperm count survival under oxidative stress with dexamethasone

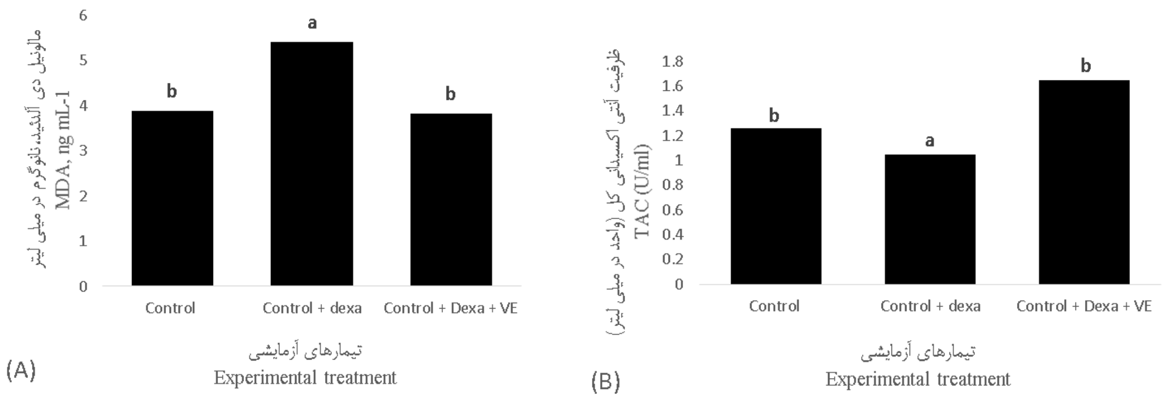
فراسنجه ها Parameters	تیمارها[1] [1]Treatments			انحراف استاندارد میانگین	احتمال معنی داری
	شاهد Control	شاهد با دگزامتازون Control with dexamethasone	ویتامین E با دگزامتازون Vitamin E with dexamethasone	SEM	P value
یک‌پارچگی غشاء (٪) Membrane integrity (%)	80.78[b]	71.92[c]	89.72[a]	1.28	<0.0001

[1] تیمارها با حروف متفاوت در هر سطر از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند ($P<0.05$).

[1] Different letters in the same row show statistically differences ($P<0.05$).

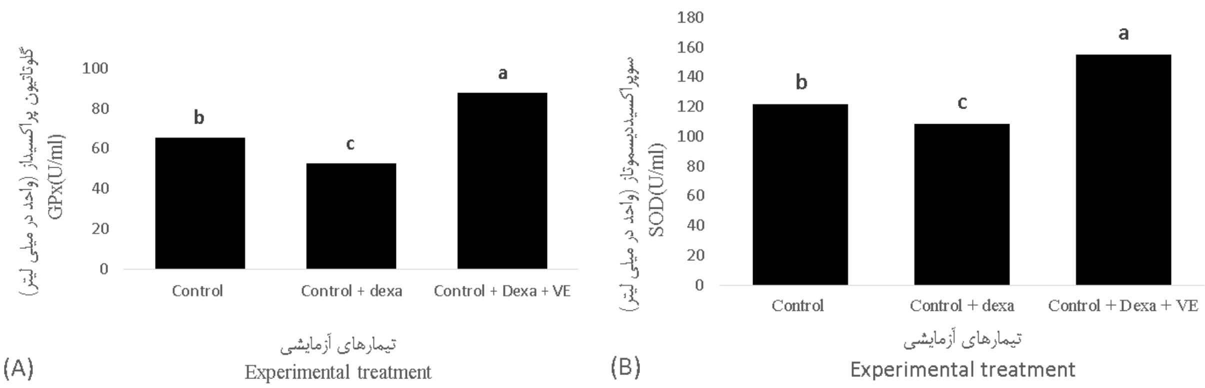
نتایج افزودن مکمل ویتامین E به جیره غذایی خروس‌های مادر تحت تنش اکسیداتیو با دگزامتازون بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی در شکل ۲ و آنزیم‌های گلوتاتیون پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز اسپرم تازه در شکل ۳ نمایش داده شده است. نتایج آزمایش نشان داد، مالون دی آلدهید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در خروس‌های تحت تنش با دگزامتازون در مقایسه با گروه شاهد و خروس‌های دریافت کننده مکمل ویتامین E افزایش یافت. بیشترین مقدار ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی وآنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نیز در اسپرم خروس های دریافت‌کننده دگزامتازون و جیره غذایی حاوی مکمل‌ویتامین E مشاهده گردید. نتایج نشان داد که افزودن ویتامین E به رژیم‌های غذایی خروس های تحت تنش اکسیداتیو باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می شود، زیرا پراکسیداسیون لیپیدها در رژیم‌های غذایی با حضور ویتامین E کاهش یافته و در نتیجه، می‌تواند منجر به افزایش تحرک و زنده‌ماندن اسپرم‌شود. علاوه‌براین، داده های آزمایش حاضر تأیید کردند که مکمل رژیم غذایی ویتامین E از بروز پراکسیداسیون لیپید اسپرم جلوگیری می کند که مطابق با نتایج سایر محققین می‌باشد (Asl *et al.*, 2018). از آنجا که ویتامین E در قسمت لیپید غشایی واقع شده است، جایی که روند لیپوپراکسیداسیون اتفاق می‌افتد، این ویتامین می‌تواند برای جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون لیپید غشایی عمل کند و بنابراین، متغیرهای کیفیت اسپرم را تقویت می‌کند (Surai *et al.*, 2001). بنابراین، می‌توان استدلال کرد که این اثرات مثبت ویتامین E بر روی تحرک اسپرم و افزایش درصد اسپرم زنده در معرض تنش اکسیداتیو می‌توانند با خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ویتامین مرتبط باشند (Brzezińska-Ślebodzińska *et al.*, 1995). MDA یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپید آلدهیدی واکنش‌پذیر و جهش‌زا در پلاسمای منی است (Shang *et al.*, 2004) و می‌تواند به‌عنوان یک ابزار تشخیصی ناباروری در نرها در نظر گرفته شود (Tavilani *et al.*, 2008). همبستگی منفی بالایی بین مالون دی آلدهید و تحرک اسپرم در خوک‌ها نشان داده شده است (Breininger *et al.*, 2005). در اسپرم خروس، کیفیت ضعیف مایع منی مانند تحرک اسپرم با مقادیر بیشتری از مالون دی آلدهید همراه است (Amini *et al.*, 2015b). پراکسیداسیون باعث ایجاد تغییرات نامطلوب در ساختار بخش آکروزومی اسپرم‌ها می‌شود و در نتیجه، تحرک و زنده‌ماندن اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد (Dimitrov *et al.*, 2007). افزایش غلظت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی (TAC[1])، ممکن است نقش معنی‌داری در مالون دی آلدهید اسپرم داشته باشد، زیرا بازدارنده های مختلفی شامل کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در اسپرم و پلاسمای منی وجود دارد که با حذف رادیکال‌های آزاد سبب حفظ اسپرم در برابر آسیب اکسیداتیو می شود. مطالعات نشان داده‌اند که در پلاسمای منی رقیق شده یک منبع مهم آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که اسپرم‌ها را در فرآیند انجماد علیه تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند که البته ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی بخاطر رقیق‌سازی پایین آمده و به همین دلیل از آنتی‌اکسیدان های خارجی علاوه‌بر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی در محیط رقیق کننده‌های منی استفاده می شود و توانایی آن‌ها در بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی گزارش شده است (Bailey *et al.*, 2000). گلوتاتیون یک تری‌پپتید داخلی است که با انتقال یک اتم هیدروژن یا یک الکترون سلول‌ها را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. همچنین در بازسازی آنتی‌اکسیدان‌های دیگر مانند اسید آسکوربیک بسیار مهم است (Steenvoorden and van Henegouwen, 1997). کمبود گلوتاتیون می‌تواند به بی‌ثباتی در قطعه میانی اسپرم و در نتیجه، تحرک معیوب آن منجر شود (Hansen and Deguchi, 1996; Ursini *et al.*, 1997). گلوتاتیون از غشای پلاسمایی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کرده، سوپراکسیدها را پاکسازی نموده، و مانع از تشکیل اکسیژن می شود. ان- استیل ال- سیستئین، پیش‌ساز گلوتاتیون است که باعث بهبود تحرک اسپرم و کاهش آسیب دیدن DNA به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن می شود (Oeda *et al.*, 1997). مطالعات نشان داده‌اند که سیستئین و گلوتاتیون باعث بهبود معنی‌دار تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم گونه‌های مختلف پستانداران بعد از فرایند انجماد- یخ گشایی می‌شود (Tuncer *et al.*, 2010). محققان نشان داده‌اند که گلوتاتیون پراکسیداز و ویتامین E جزء اصلی سیستم آنتی‌اکسیدانی اسپرم خروس هستند (Surai *et al.*, 1998; Surai *et al.*, 1997a).
سوپراکسیددیسموتاز یکی از کارآمدترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بدن می‌باشد و اولین خط دفاعی بدن در برابر گونه‌های فعال اکسیژن است که تبدیل آنیون سوپراکسید (O_2^-) را به هیدروژن پراکسید و اکسیژن، تسریع می‌کند که سپس، هیدروژن پراکسید تولید شده توسط گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز حذف می‌گردد (Carocho and Ferreira, 2013). مطالعات انجام شده روی اثرات افزودن آلفاتوکوفرول، آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و اسید آسکوربیک نشان می‌دهند که این ترکیبات با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌هایی که در طول انجماد- یخ گشایی ایجاد می‌شوند، محافظت می‌کند (Malo *et al.*, 2011).

1 - Total antioxidant capacity



شکل ۲- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر مالونیل دی آلدئید(A) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (B) اسپرم خروس تحت تنش اکسیداتیو با دگزامتازون

Figure 2- Effects of vitamin E supplementation on MDA (a) and TAC (B) of rooster sperm under oxidative stress with dexamethasone



شکل ۳- اثرات افزودن مکمل ویتامین E بر آنزیم‌های گلوتاتیون پروکسیداز (A) و سوپر اکسید دیسموتاز (B) اسپرم خروس تحت تنش اکسیداتیو با دگزامتازون

Figure 3- Effects of vitamin E supplementation on GPx (A) and SOD (B) enzymes of rooster sperm under oxidative stress with dexamethasone

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد، القای تنش اکسیداتیو در بدن با تزریق دگزامتازون سبب افت شدید در شاخص‌های حرکتی اسپرم شامل تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، شاخص های حرکتی، یکپارچگی غشای پلاسمایی، زنده‌مانی اسپرم شد. همچنین تنش اکسیداتیو سبب افزایش مالون دی‌آلدهید و کاهش یکپارچگی غشای پلاسمایی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز اسپرم شد. گنجاندن ویتامین E به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی سبب بهبود قابل توجه در زنده‌مانی (۲۰ درصد) و خصوصیات حرکتی شامل تحرک کل (۴۶ درصد)، تحرک پیش‌رونده (۲۲ درصد)، میانگین سرعت در مسیر (۵۰ درصد)، جنبایی عرضی سر (۹۱ درصد) و وضعیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم در خروس‌های مادر گوشتی تحت تنش اکسیداتیو در سن ۲۸ هفتگی شد.

References

1. Akiba, Y., Ngago, H., & Horiguchi, M. (1992). Effects of corticosterone injected at graded dose levels and implanted with tube at low levels on growth and hepatic lipid and abdominal fat deposition in broiler chickens. *Japanese Poultry Science*, 29,287-295. https://doi.org/10.2141/jpsa.29.287
2. Amini, M. R., Kohram, H., Shahaneh, A. Z., Zhandi, M., Sharideh, H., & Nabi, M. M. (2015a). The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell Tissue Banking, 16,587-592. https://doi.org/10.1007/s10561-015-9506-9
3. Amini, M. R., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H., & Nabi, M. M. (2015b). The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*, 70,226-232. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.001
4. Asl, R. S., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Torshizi, M. A. K., & Shahverdi, A. (2018). Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. *Cryobiology*, 84,15-19. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.008
5. Bailey, J. L., Bilodeau, J., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21,1-7.
6. Benhenia, K., Rahab, H., Smadi, M.-A., Benmakhlouf, H., Lamara, A., Idres, T., & Iguer-Ouada, M. (2018). Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Animal Reproduction Science*, 195,266-273. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.004
7. Breininger, E., Beorlegui, N. B., O'Flaherty, C. M., & Beconi, M. T. (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63,2126-2135. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.016
8. Brzezińska-Ślebodzińska, E., Ślebodziński, A., Pietras, B., & Wieczorek, G. (1995). Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*, 47,69-74. https://doi.org/10.1007/BF02790102
9. Burrows, W., & Quinn, J. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16,19-24. https://doi.org/10.3382/ps.0160019
10. Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chemical Toxicology*, 51,15-25. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021
11. da Silva Maia, M., Bicudo, S. D., Azevedo, H. C., Sicherle, C. C., de Sousa, D. B., & Rodello, L. (2009). Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, 85,85-90. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.07.001
12. Danikowski, S., Sallmann, H. P., Halle, I., & Flachowsky, G. (2002). Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, 86,376-382. https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00396.x
13. De Lamirande, E., & Ggnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*, 13,368-378.
14. Dimitrov, S., Atanasov, V., Surai, P., & Denev, S. (2007). Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 100,311-317. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.07.007
15. Eid, Y., Ebeid, T., & Younis, H. (2006). Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *British Poultry Science*, 47,350-356. https://doi.org/10.1080/00071660600753912
16. Eid, Y., Ohtsuka, A., & Hayashi, K. (2003). Tea polyphenols reduce glucocorticoid-induced growth inhibition and oxidative stress in broiler chickens. *British Poultry Science*, 44,127-132. https://doi.org/10.1080/0007166031000085427
17. El-Habbak, M., Abou-EL-Soud, S., & Ebeid, T. (2005). Effect of induced stress by dexamethasone administration on performance, egg quality and some blood parameters of laying hens. *Egyptian Poultry Science*, 25,89-105.
18. El-Lethey, H., Aerni, V., Jungi, T., & Wechsler, B. (2000). Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. *British Poultry Science*, 41,22-28. https://doi.org/10.1080/00071660086358
19. Eskenazi, B., Kidd, S., Marks, A., Sloter, E., Block, G., & Wyrobek, A. (2005). Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 20,1006-1012. https://doi.org/10.1093/humrep/deh725
20. Evans, G., & Maxwell, W. C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths.
21. Fowles, J. R., Fairbrother, A., Fix, M., Schiller, S., & Kerkvliet, N. I. (1993). Glucocorticoid effects on natural and humoral immunity in mallards. *Developmental Comparative Immunology*, 17,165-177. https://doi.org/10.1016/0145-305X(93)90026-M
22. Franchini, A., Bergonzoni, M. L., Melotti, C., & Minelli, G. (2001). The effects of dietary supplementation with high doses of vitamin E and C on the quality traits of chicken semen. "*Archiv für Geflügelkunde*, 65 (2001): 76-81
23. Gross, W. (1993). General principles of stress and welfare. *Livestock Handling Transport*,21-33.

24. Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M., & Ma, T. Y. (2013). Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, 182,375-387. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.014
25. Hansen, J., & Deguchi, y. (1996). Selenium and fertility in animals and man--a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 37,19-30. https://doi.org/10.1186/BF03548116
26. John Aitken, R., Clarkson, J. S., & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41,183-197. https://doi.org/10.1095/biolreprod41.1.183
27. Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., & Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2,246-256. https://doi.org/10.1093/humupd/2.3.246
28. Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A., Cinque, C., & Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 27,119-127. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00014-9
29. Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F., & Galé, I. (2011). Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75,1735-1741. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.013
30. Marin-Guzman, J., Mahan, D., & Pate, J. (2000). Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *Journal of Animal Science*, 78,1537-1543. https://doi.org/10.2527/2000.7861537x
31. Min, Y., Niu, Z., Sun, T., Wang, Z., Jiao, P., Zi, B., Chen, P., Tian, D., & Liu, F. (2018). Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene. *Poultry Science*, 97,1238-1244. https://doi.org/10.3382/ps/pex417
32. Mishra, B., & Jha, R. (2019). Oxidative stress in the poultry gut: Potential challenges and interventions. *Frontiers in Veterinary Science*, 6,60. https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00060
33. Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharafi, M., Nabi, M. M., Zahedi, V., & Sharideh, H. (2016). Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? *Cryobiology*, 72,264-268. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.008
34. Nemati, Z., Ahmadian, H., Besharati, M., Lesson, S., Alirezalu, K., Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2020a). Assessment of Dietary Selenium and Vitamin E on Laying Performance and Quality Parameters of Fresh and Stored Eggs in Japanese Quails. *Foods*, 9,1324. https://doi.org/10.3390/foods9091324
35. Nemati, Z., Alirezalu, K., Besharati, M., Amirdahri, S., Franco, D., & Lorenzo, J. M. (2020b). Improving the Quality Characteristics and Shelf Life of Meat and Growth Performance in Goose Fed Diets Supplemented with Vitamin E. *Foods*, 9,798. https://doi.org/10.3390/foods9060798
36. Nemati, Z., Dehgani, P., Besharati, M., & Amirdahri, S. (2022). Dietary carob fruit (Ceratonia siliqua L.) supplementation improves spermatogenesis, semen quality and embryonic death via antioxidant effect in aging broiler breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 239,0378-4320. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106967
37. Nemati, Z., Janmohammadi, H., Taghizadeh, A., Moghaddam, G., & Maleki Nejad, H. 2014a. Effect of bentonite supplementation to the contaminated diets with aflatoxin B1 on broiler performance. In: 6th Iranian congress on animal science, Tabriz
38. Nemati, Z., Janmohammadi, H., Taghizadeh, A., Nejad, H. M., Mogaddam, G., & Arzanlou, M. (2014b). Occurrence of Aflatoxins in poultry feed and feed ingredients from northwestern Iran. *European Journal of Zoological Research*, 3,56-60.
39. Nemati, Z., Karimi, A., & Besharati, M. 2015. Impact of Aflatoxin Contaminated Feed and Yeast Cell Wall Supplementation on Immune System in Broiler Chickens. In: Proceedings of International Conference on Innovations in Chemical & Agricultural Engineering. p 8-9.
40. Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology Medicine*, 66,3-12. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022
41. Oeda, T., Henkel, R., Ohmori, H., & Schill, W. B. (1997). Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? *Andrologia*, 29,125-131. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1997.tb00305.x
42. Ohtsuka, A., Hayashi, K., Noda, T., & Tomita, Y. (1992). Reduction of corticosterone-induced muscle proteolysis and growth retardation by a combined treatment with insulin, testosterone and high-protein-high-fat diet in rats. *Journal of Nutritional Science Vitaminology*, 38,83-92. https://doi.org/10.3177/jnsv.38.83
43. Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007a). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction Development*, 74,878-892. https://doi.org/10.1002/mrd.20686
44. Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007b). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74,878-892. https://doi.org/10.1002/mrd.20686

45. Revell, S., & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36,77-86. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90055-8
46. Rover Júnior, L., Höehr, N. F., Vellasco, A. P., & Kubota, L. T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. Química Nova, 24,112-119. https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100019
47. Shang, X.-J., Li, K., Ye, Z.-Q., Chen, Y.-G., Yu, X., & Huang, Y.-F. (2004). Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by high-performance liquid chromatography. *Archives of Andrology*, 50,411-416. https://doi.org/10.1080/01485010490484138
48. Siegel, H. (1980). Physiological stress in birds. *Bioscience*, 30,529-534. https://doi.org/10.2307/1307973
49. Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., & Guerra, M. M. P. (2013). Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 137,37-44. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.12.002
50. Steenvoorden, D. P., & van Henegouwen, G. M. B. (1997). The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, 41,1-10. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00081-X
51. Surai, P., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J.-P., Wishart, G., Cerolini, S., & Sparks, N. (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 120,527-533. https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10039-1
52. Surai, P., Fujihara, N., Speake, B., Brillard, J., Wishart, G., & Sparks, N. (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14,1024-1050. https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1024
53. Surai, P., Ionov, I., Kostyuk, I., Wishart, G., Speake, B., Noble, R., Macpherson, A., & Sparks, N. (1997a). Effect of vitamin E and selenium in the cockerel's diet on lipid peroxidation in the spermatozoa. *British Poultry Science*, 38,S54-S55.
54. Surai, P., Kutz, E., Wishart, G., Noble, R., & Speake, B. (1997b). The relationship between the dietary provision of α-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Reproduction*, 110,47-51. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100047
55. Taniguchi, N., Ohtsuka, A., & Hayashi, K. (1999). Effect of dietary corticosterone and vitamin E on growth and oxidative stress in broiler chickens. Nihon Chikusan Gakkaiho, 70,195-200. https://doi.org/10.2508/chikusan.70.195
56. Tavilani, H., Goodarzi, M. T., Vaisi-Raygani, A., Salimi, S., & Hassanzadeh, T. (2008). Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *International Braz J Urol*, 34,485-491. https://doi.org/10.1590/S1677-55382008000400011
57. Towhidi, A., & Parks, J. (2012). Effect of n-3 fatty acids and α-tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, 29,1051-1056. https://doi.org/10.1007/s10815-012-9834-7
58. Tuncer, P. B. et al. (2010). The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, 61,303-307. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.009
59. Ursini, F., Maiorino, M., & Roveri, A. (1997). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx): more than an antioxidant enzyme? *Biomedical Environmental Sciences*: BES, 10,327-332.
60. Welberg, L. A., & Seckl, J. R. (2001). Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *Journal* of *Neuroendocrinology*, 13,113-128. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2001.00601.x
61. Wishart, G. (1984). Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. *Reproduction*, 71,113-118. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0710113
62. Zhang, J., Nicholls-Grzemski, F., Tirmenstein, M., & Fariss, M. (2001). Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chemico-Biological Interactions*, 138,267-284. https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00278-2